

丙二醛 (MDA) 测试盒说明书

(货号:BC021-2 TBA法)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

本试剂盒是在国内外众多测试方法的基础上改进的一种微量、快速、简便、准确、对操作人员健康无损害的测试方法。通过测试可反映出血清(浆)、乳汁等细胞外液、红细胞、白细胞、培养细胞以及各种动植物的细胞水平及亚细胞水平的脂质过氧化物的量。

一、测定意义:

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基, 后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA), 引发脂质过氧化作用, 并因此形成脂质过氧化物。如: 醛基(丙二醛MDA)、酮基、羟基、羧基、氢过氧基或内过氧基, 以及新的氧自由基等。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂, 即非自由基性的脂类分解产物, 而且通过链式或链式支链反应, 放大活性氧的作用。因此, 初始的一个活性氧能导致很多脂类分解产物的形成, 这些分解产物中, 一些是无害的, 另一些则能引起细胞代谢及功能障碍, 甚至死亡。氧自由基不但通过生物膜中多不饱和脂肪酸 (PUFA) 的过氧化引起细胞损伤, 而且还能通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤。因而测试 MDA 的量常常可反映体内脂质过氧化的程度, 间接地反映出细胞损伤的程度。

MDA 的测定常常与 SOD 的测定相互配合, SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力, 而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度, 通过 SOD 与 MDA 的结果分析有助于医学、生物学、药理及工农业生产的发展。

二、测试原理:

过氧化脂质降解产物中的丙二醛 (MDA) 可与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合, 形成红色产物, 在 532nm 处有最大吸收峰。因底物为硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric Acid TBA) 所以此法称 TBA 法。

三、测试所需仪器设备:

可见光分光光度计或酶标仪, 可调到 95℃ 左右的恒温水浴箱或沸水锅, 离心机, 10mL 离心管。

四、试剂盒组成与配制(50管/48样 A003-1-1):

试剂一: 液体 10mL×1 瓶, 室温保存。(天冷时会凝固, 每次测试前可 37℃ 加热以加速溶解, 直至透明方可应用)。

试剂二: 液体 6mL×1 瓶, 用时每瓶加 170mL 蒸馏水混匀, 4℃ 冷藏。(注意不要碰到皮肤上)。

试剂三: 粉剂×1 支, 用时将粉剂加蒸馏水 30mL, 加热到 90℃~100℃ 充分溶解后用蒸馏水补足至 30mL, 再加冰醋酸 30mL, 混匀, 配好的试剂避光冷藏。

标准品: 10nmol/mL 四乙氧基丙烷 5mL×1 瓶, 4℃ 冷藏。

[注]: 冰醋酸(分析纯, 乙酸浓度≥99.5%); 测试盒冷藏至少可保存一年。

五、试剂盒组成与配制(100管/96样 A003-1-2):

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 室温保存。(天冷时会凝固, 每次测试前可 37℃ 加热以加速溶解, 直至透明方可应用)。

试剂二: 液体 12mL×1 瓶, 用时每瓶加 340mL 蒸馏水混匀, 4℃ 冷藏(注意不要碰到皮肤上)。

试剂三: 粉剂×1 支, 用时将粉剂加蒸馏水 60mL, 加热到 90℃~100℃ 充分溶解后用蒸馏水补足至 60mL, 再加冰醋酸 60mL, 混匀, 配好的试剂避光冷藏。

标准品: 10nmol/mL 四乙氧基丙烷 5mL×1 瓶, 4℃ 冷藏。

[注]: 冰醋酸(分析纯, 乙酸浓度≥99.5%); 测试盒冷藏至少可保存一年。

六、操作步骤:

1、操作表:

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/mL 标准品 (mL)		a*		
无水乙醇 (mL)	a*			
测试样品 (mL)			a*	a*
试剂一 (mL)	a*	a*	a*	a*
混匀(摇动几下离心管架)				
试剂二 (mL)	3	3	3	3
试剂三 (mL)	1	1	1	
50%冰醋酸 (mL)				1

离心管盖上盖, 用针在盖上扎一小孔, 旋涡混匀器混匀, 95℃ 水浴 (或用锅开盖煮沸) 40 分钟, 取出后流水冷却, 然后 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟, (3000 转/分以下离心时间需延长, 目的使沉淀完全)。取上清***, 532nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值。

[注]: a*: 表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、试剂一的量, 四者均相等。(a* 一般取 0.1-0.2mL)

例如样品取 0.1mL 则标准品、无水乙醇、试剂一也取 0.1mL, 若样品取 0.2mL 则标准品、无水乙醇及试剂一也取 0.2mL。因吸光度与加样量呈正比曲线, 故结果不受影响。

** 一般情况下, 标准管、空白管及对照管每批只需做 1~2 只, 若样本不存在溶血、脂血现象, 则对照管可以不测, 用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中, 尽量避免倾倒, 以免沉淀进入比色皿, 影响吸光度。

- 2、**参考取样量：**血清（浆）取0.1~0.2mL。低密度脂蛋白悬液取0.1~0.2mL。食油取0.03mL。肝组织、心肌、肌肉组织、螺旋藻等，取5%或10%匀浆0.1~0.2mL较好。
- 3、**标准管参考吸光度：**当标准品取样量为0.1mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.065~0.070（酶标仪测定取200 μ L读数时为0.04左右）。当标准品取样量为0.2mL时，则标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.130~0.140（酶标仪测定取200 μ L读数时为0.08左右）。
- 4、**规范操作方法及简便操作方法中，若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间40分钟延长至80分钟，但您的同一课题中MDA的检测都必须延长至80分钟，以免造成批间差异。**

5、**计算公式：**

(1)、**血清（浆）中MDA含量计算公式：**

$$\text{血清(浆)中MDA含量 (nmol/ml)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

(2)、**组织中MDA含量计算公式：**

$$\text{组织中MDA含量 (nmol/mgprot)*} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{(mgprot/ml)}$$

[注]：* nmol/mgprot为纳摩尔/毫克蛋白

6、**计算举例：**

例1：取某未稀释血清0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.036，标准管吸光度0.076，标准空白管吸光度0.006，对照管用标准空白管来代替。计算结果如下：

$$\begin{aligned} \text{血清(浆)中MDA含量 (nmol/ml)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}} \\ &= \frac{0.036 - 0.006}{0.076 - 0.006} \times 10\text{nmol/ml} \times 1 = 4.29\text{nmol/ml} \end{aligned}$$

例2：取0.1mL蛋黄，加入0.9mL无水乙醇，充分混匀抽提3分钟，4000转/分离心10分钟取上清0.2mL检测MDA含量，测定管吸光度0.198，标准管吸光度0.151，标准空白管吸光度0.009，对照管用标准空白管来代替。计算结果如下：

$$\begin{aligned} \text{MDA含量 (nmol/ml)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}} \\ &= \frac{0.198 - 0.009}{0.151 - 0.009} \times 10\text{nmol/ml} \times 10 = 133.098\text{nmol/ml} \end{aligned}$$

例3：取10%的大鼠肝组织匀浆0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.214，标准管吸光度0.079，标准空白管吸光度0.009，对照管用标准空白管来代替。10%的大鼠肝匀浆的蛋白浓度8.5mgprot/mL，计算结果如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中MDA含量 (nmol/mgprot)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{(mgprot/ml)} \\ &= \frac{0.214 - 0.009}{0.079 - 0.009} \times 10\text{nmol/ml} \div 8.5\text{mgprot/ml} = 3.45\text{nmol/mgprot} \end{aligned}$$

例4：取10%的鲤鱼脑组织匀浆0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.314，标准管吸光度0.076，标准空白管吸光度0.006，对照管用标准空白管来代替。10%的鲤鱼脑组织匀浆的蛋白浓度5.0788mgprot/mL，计算如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中MDA含量 (nmol/mgprot)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{(mgprot/ml)} \\ &= \frac{0.314 - 0.006}{0.076 - 0.006} \times 10\text{nmol/ml} \div 5.0788\text{mgprot/ml} = 8.663\text{nmol/mgprot} \end{aligned}$$

例5：取20%的蚯蚓组织匀浆0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.082，标准管吸光度0.074，标准空白管吸光度0.005，对照管吸光度0.025。20%的蚯蚓组织匀浆的蛋白浓度10.3145mgprot/mL，计算如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中MDA含量 (nmol/mgprot)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{(mgprot/ml)} \\ &= \frac{0.082 - 0.025}{0.074 - 0.005} \times 10\text{nmol/ml} \div 10.3145\text{mgprot/ml} = 0.8009\text{nmol/mgprot} \end{aligned}$$

例6：取10%的水稻叶片匀浆0.2mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.077，标准管吸光度0.140，标准空白管吸光度0.003，对照管用标准空白管来代替。10%的水稻叶片匀浆的蛋白浓度3.2729mgprot/mL，计算结果如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中MDA含量 (nmol/mgprot)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{(mgprot/ml)} \\ &= \frac{0.077 - 0.003}{0.140 - 0.003} \times 10\text{nmol/ml} \div 3.2729\text{mgprot/ml} = 1.6504\text{nmol/mgprot} \end{aligned}$$

七、简便操作方法：（如果样本数量很多，您可以采用简便操作方法。）

1、混合试剂的配制：

工作液 I 的配制：试剂一：试剂二：试剂三= a*：3：1，用多少配多少，配好后当天测定；

工作液 II 的配制：试剂一：试剂二：50%冰醋酸= a*：3：1，用多少配多少，配好后当天测定。

2、简便操作表：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/mL标准品（mL）		a*		
无水乙醇（mL）	a*			
测试样品（mL）			a*	a*
工作液 I（mL）	4mL	4mL	4mL	
工作液 II（mL）				4mL

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅盖煮沸）40分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

[注1]:a*表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、试剂一的量，四者均相等。例如样品取0.1mL则标准品、无水乙醇、试剂一也取0.1mL，若样品取0.2mL则标准品、无水乙醇及试剂一也取0.2mL。因吸光度与加样量呈正比曲线，因而结果不受影响。

** 对照管可省略不做,用空白管来代替。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

[注2]: 以上规范操作法及简便操作法适用于人及各种动植物的样本（包括血清、动植物组织及体液、细胞及细胞培养液等）。

[注3]: 规范操作法及简便操作法中，若发现检测样本吸光度太低，可将水浴时间40分钟延长至80分钟，但您的同一课题中MDA的检测都必须延长至80分钟，以免造成批间差异。

3、计算公式：

(1)、血清（浆）中MDA含量计算公式：

$$\text{血清（浆）中MDA含量} \frac{(\text{nmol/ml})}{=} \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前} \times \text{稀释倍数}$$

(2)、组织中MDA含量计算公式：

$$\text{组织中MDA含量} \frac{(\text{nmol/mgprot})}{=} \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \div \text{待测样本蛋白浓度}$$

4、计算举例：

例1: 取某未稀释血清0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.041，标准管吸光度0.080，标准空白管吸光度0.011，对照管用标准空白管来代替。计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清（浆）中MDA含量} \frac{(\text{nmol/ml})}{=} & \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前} \times \text{稀释倍数} \\ & = \frac{0.041 - 0.011}{0.080 - 0.011} \times 10 \text{nmol/ml} \times 1 = 4.34 \text{nmol/ml} \end{aligned}$$

例2: 取10%的大鼠肝组织匀浆0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.204，标准管吸光度0.082，标准空白管吸光度0.013，对照管用标准空白管来代替。10%的大鼠肝匀浆的蛋白浓8.1mgprot/mL，计算如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中MDA含量} \frac{(\text{nmol/mgprot})}{=} & \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \div \text{待测样本蛋白浓度} \\ & = \frac{0.204 - 0.013}{0.082 - 0.013} \times 10 \text{nmol/ml} \div 8.1 \text{mgprot/ml} = 3.42 \text{nmol/mgprot} \end{aligned}$$

八、对于MDA含量很低或样本量少的样本可用微量操作方法，例如小鼠血清（浆）、小儿血清（浆）、小鼠肺组织、皮肤组织、肾组织、视网膜、细胞及细胞培养液等可用以下方法进行检测：

(一)、样本前处理见实验方法学中的组织匀浆处理，可制成10%或5%的匀浆，但要注意，因样本量很少，所以做好的组织匀浆最好不要离心,例如培养的细胞等破碎后可以不离心。取样时注意要摇匀后立即取样。

(二)、试剂组成与配制：

1、(100管)微量操作法中的试剂三配制如下：

①、按规范操作方法来配制MDA 3号试剂：将1支MDA 3号粉剂倒入烧杯内加90℃~100℃的热蒸馏水64mL*，充分溶解（溶解过程中可适当加热）。冷却后加冰醋酸60mL混匀。

②、再将上述配好的MDA 3号试剂用50%冰醋酸**按2:1进行稀释，用多少配

多少。例如您需要用微量法测MDA需要试剂三为15mL，则可以取上述按规范操作法配好的试剂三10mL加50%冰醋酸5mL，混匀即可。配好的试剂避光4℃冰箱冷藏（冰醋酸自备）。

[注]：* 因蒸馏水热胀冷缩，加热过程要蒸发，本应加60mL，现多加4mL，冷却后在60mL。

** 50%冰醋酸的配制是50mL蒸馏水加50mL冰醋酸混合而成的。

*** 冰醋酸又名乙酸，分析纯，乙酸浓度≥99.5%。

2、(50管)微量操作法中的试剂三配制如下：

①、按规范操作方法来配制MDA 3号试剂：将1支MDA 3号粉剂倒入烧杯内加90℃~100℃的热蒸馏水32mL*，充分溶解（溶解过程中可适当加热）。冷却后加冰醋酸30mL混匀。

②、再将上述配好MDA 3号试剂用50%冰醋酸按2:1进行稀释，用多少配多少。例如您需要用微量法测MDA需要试剂三为15mL，则可以取上述按规范操作法配好的试剂三10mL加50%冰醋酸5mL，混匀即可。配好的试剂避光4℃冰箱冷藏（冰醋酸自备***）。

[注]：* 因蒸馏水热胀冷缩，加热过程要蒸发，本应加30mL，现多加2mL，冷却后在30mL。

** 50%冰醋酸的配制是50mL蒸馏水加50mL冰醋酸混合而成的。

*** 冰醋酸又名乙酸，分析纯，乙酸浓度≥99.5%。

(三)、操作步骤：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL标准品(mL)		a*		
无水乙醇 (mL)	a*			
测试样品 (mL)			a*	a*
试剂一 (mL)	a*	a*	a*	a*
混匀（摇动几下离心管架）				
试剂二 (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂三 (mL)	1.5	1.5	1.5	
50%冰醋酸 (mL)				1.5

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a*表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、试剂一的量，四者均相等。例如样品取0.1mL则标准品、无水乙醇及试剂一也取0.1mL，若样品取0.2mL则标准品、无水乙醇及试剂一也取0.2mL。因吸光度与加样量呈正比曲线，因而结果不受影响。

** 一般情况下，标准管、空白管及对照管每批只需做1~2只，若样本不存在溶血、脂血现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

注①：用此方法所测各管吸光度值比规范操作方法要高，但不影响最终结果。

注②：5%组织匀浆a*取0.1~0.2mL进行检测较好。

注③：若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间40分钟延长至80分钟，但您的同一课题中MDA的检测都必须延长至80分钟，以免造成批间差异。

注④：此方法标准管参考吸光度：当标准品取样量为0.1mL时，则标准管吸光度减去空白管吸光度为0.103~0.112。当标准品取样量为0.2mL时，则标准管吸光度减去空白管吸光度为0.206~0.224。

(四)、计算公式及举例：

1、计算公式：

(1)、血清（浆）中MDA含量计算公式：

$$\text{血清（浆）中MDA含量} (\text{nmol/ml}) = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} (\text{10nmol/ml}) \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

(2)、组织中MDA含量计算公式：

$$\text{组织中MDA含量} (\text{nmol/mgprot}) = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} (\text{10nmol/ml}) \div \text{待测样本蛋白浓度} (\text{mgprot/ml})$$

* nmol/mgprot为纳摩尔/毫克蛋白

2、计算举例：

例1:取某人未稀释血清0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.030，标准管吸光度0.104，标准空白管吸光度0.009，对照管用标准空白管来代替。计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清（浆）中MDA含量} (\text{nmol/ml}) &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} (\text{10nmol/ml}) \times \text{样本测试前稀释倍数} \\ &= \frac{0.030 - 0.009}{0.104 - 0.009} \times 10 \text{nmol/ml} \times 1 = 2.21 \text{nmol/ml} \end{aligned}$$

例2:取5%的大鼠肺组织匀浆0.1mL，检测MDA含量，测定管吸光度0.062，标准管吸光度0.104，标准空白管吸光度0.009，对照管用标准空白管来代替。5%的大鼠肺组织匀浆蛋白浓度2.45mg/mL，计算如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中MDA含量} (\text{nmol/mgprot}) &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} (\text{10nmol/ml}) \div \text{待测样本蛋白浓度} (\text{mgprot/ml}) \\ &= \frac{0.062 - 0.009}{0.104 - 0.009} \times 10 \text{nmol/ml} \div 2.45 \text{mgprot/ml} = 2.28 \text{nmol/mgprot} \end{aligned}$$

九、高脂血症样本或者需要测定油脂中的MDA，例如豆油或色拉油、菜油中的MDA量，可以用下面的方法测定。

(一)、极轻微的高脂血症检测方法：（血清或血浆看上去透亮度比较差，可以按一般操作表，也可以按中度高脂血症检测法。）

1、操作方法：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/mL标准品 (mL)		a*		
无水乙醇(mL)	a*			
油脂类样品或高脂血清 (浆)			a*	a*
试剂一(mL)	a*	a*	a*	a*
混匀（摇动几下离心管架）				
试剂二 (mL)	3.0	3.0	3.0	3.0
试剂三 (mL)	1.0	1.0	1.0	
50%冰醋酸 (mL)				1.0

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）80分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a* 为样本取样量，高脂血症血清(浆)取样量为100μL，油脂为30~50μL，标准品、样本、试剂一为相同量。

** 一般情况下，标准管、空白管及对照管每批只需做1~2只，若样本不存在溶血、脂血现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

2、标准管参考吸光度：当标准品取样量为0.1mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.065~0.070（酶标仪测定取200μL读数时为0.045左右）。当标准品取样量为0.2mL时，则标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.130~0.140（酶标仪测定取200μL读数时为0.1左右）。

3、计算公式及举例：

(1)、计算公式：

$$\text{血清(浆)中MDA含量 (nmol/ml)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

(2)、计算举例：

取高脂血症家兔血清按操作表进行MDA检测。测得标准管吸光度0.080，测定管吸光度0.046，空白管吸光度0.010，对照管用标准空白管来代替。则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清中MDA含量 (nmol/ml)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \\ &= \frac{0.046 - 0.010}{0.080 - 0.010} \times 10 = 5.14\text{nmol/ml} \end{aligned}$$

(二)、中度高脂血症检测方法：（血清或血浆比较混浊）

1、样本前处理：

中度高脂血症的样本在测试前可用生理盐水稀释，稀释倍数可以为1:2或1:3。

2、操作方法：

(1)、操作方法①表：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL标准品(mL)		a*		
无水乙醇 (mL)	a*			
已稀释的中度高脂血症血清 (浆)			a*	a*
试剂一(mL)	a*	a*	a*	a*
混匀（摇动几下离心管架）				
试剂二 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
试剂三 (mL)	1.0	1.0	1.0	
50%冰醋酸 (mL)				1.0

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）80分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a* 为样本取样量，标准品、无水乙醇、及试剂一的量均相等，样本测试前可用生理盐水稀释，稀释倍数可为1:2或1:3，取样量可为0.1mL也可以0.2mL或者0.3mL标准品，无水乙醇，试剂一、均与取样量相等。

** 一般情况下，标准管、空白管及对照管每批只需做1~2只，若样本不存在溶血、脂血现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

(2)、操作方法②表：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10nmol/mL标准品(mL)		a*		
无水乙醇 (mL)	a*			
中度高脂血症血清 (浆)			a*	a*
生理盐水	2a*	2a*	2a*	2a*
混匀（摇动几下离心管架）				
试剂一(mL)	4a*	4a*	4a*	4a*
混匀（摇动几下离心管架）				
试剂二 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
试剂三 (mL)	1.0	1.0	1.0	
50%冰醋酸 (mL)				1.0

--	--	--	--	--

旋涡混匀器混匀，离心管口用保鲜薄膜扎紧，用针头刺一小孔，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）80分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，

（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a*为样本取样量，标准品、无水乙醇、样本量均相等，生理盐水的量为样本的两倍，试剂一的量为样本的四倍。例如高脂血清取0.1mL，则标准品，无水乙醇取0.1mL，生理盐水取0.2mL，试剂一取0.4mL。

** 一般情况下，标准管、空白管及对照管每批只需做1~2只，若样本不存在溶血、脂血现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

3、标准管参考吸光度：此方法标准管参考吸光度：当标准品取样量为0.1mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.113~0.122。当标准品取样量为0.2mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.216~0.234。

4、计算公式及举例：

(1)、计算公式：

$$\text{血清(浆)中MDA含量} \text{ (nmol/ml)} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

(2)、计算举例：

例1: 取高脂血症家兔血清按操作表进行MDA检测。测得标准管吸光度为0.124，测定管吸光度为0.101，标准空白管吸光度为0.010，

对照管用标准空白管来代替。则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清中MDA含量} \text{ (nmol/ml)} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}} \\ &= \frac{0.101 - 0.010}{0.124 - 0.010} \times 10 \times 1 = 7.98\text{nmol/ml} \end{aligned}$$

(三)、高度高脂血症检测方法：（血清或血浆呈乳白色豆浆样）

1、操作方法：

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL标准品(mL)		a*		
无水乙醇 (mL)	a*			
油脂类样品或高脂血清 (浆)			a*	a*
无水乙醇 (mL)	2a*	2a*	2a*	2a*
充分抽提（混匀）1分钟				
试剂一(mL)	3a*	3a*	3a*	3a*
混匀（摇动几下离心管架）				
试剂二 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
试剂三 (mL)	1.0	1.0	1.0	
50%冰醋酸 (mL)				1.0

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）80分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a*为样本取样量，标准品、无水乙醇、样本量均相等，试剂一的量为样本的三倍。例如高脂血清取0.1mL，则标准品、无水乙醇取0.1mL，试剂一取0.3mL。

** 一般情况下，标准管、空白管及对照管每批只需做1~2只，若样本不存在溶血、脂血现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

2、标准管参考吸光度：此方法标准管参考吸光度：当标准品取样量为0.1mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.114~0.123。当标准品取样量为0.2mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.216~0.235。

3、计算公式及举例：

(1)、计算公式：

$$\text{血清(浆)中MDA含量} \text{ (nmol/ml)} = \frac{\text{测定管OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

(2)、计算举例：

例1: 取高脂血症家兔血清按操作表进行MDA检测。测得标准管吸光度为0.126，测定管吸光度为0.119，空白管吸光度为0.010，对照管用标准空白管来代替。

则计算如下：

$$\begin{aligned} \text{血清中MDA含量} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10\text{nmol/ml})} \\ (\text{nmol/ml}) &= \frac{0.119 - 0.010}{0.126 - 0.010} \times 10 = 9.40\text{nmol/ml} \end{aligned}$$

十、红细胞中的MDA检测方法

(一)、微量红细胞中的MDA检测方法（样本量少时用）

1、样本前处理：（可用以下二种方法中的一种）

(1)、载玻片取全血，进行MDA测定：

如果您所需测的血样很少又很珍贵，例如新生儿指血，或小老鼠的尾血，可采用载玻片上滴加1~2滴肝素涂匀，60℃以下烤干，或自然吹干。将以上采取的少量血样滴在有肝素的载玻片上，用微量加样器取您所需的血量，再制备成1：99的溶血液。（即全血：蒸馏水=1：99）

(2)、玻璃微量采血管采集红细胞及溶血液的制备：

①、用20μL的玻璃微量采血管取载玻片上的肝素抗凝全血20μL左右。将玻璃毛细管置水平位，迅速取下吸球，将空隙长的一端放在酒精灯火焰的三分之一处烧至透红，管端变成圆球状闭结为止。用尺测量并记录血柱长度a厘米。用纸将采血管卷好，然后将采血管封闭端朝下装入离心管中，1500转/分离心5~10分钟，取出后用小砂轮在血清与红细胞分界处划开掰断（或用剪刀直接剪断）。将有红细胞的开口端倒放入装有1mL蒸馏水的离心管中，再以1500转/分离心5分钟，此时毛细管中的红细胞沉淀于离心管底部，用镊子从离心管中取出毛细管丢弃后，将离心管放在混匀器上旋涡混匀制成溶血液。

②、血液稀释倍数的计算：稀释倍数 = 双蒸水体积 ÷ $\left(\frac{\text{血球柱长度}a}{\text{采血管}20\mu\text{L容积长度}} \times 20\mu\text{L} \right)$

2、MDA检测操作步骤：

①、方法一：（规范操作方法）

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL标准品		a*		
无水乙醇（mL）	a*			
1:x血球溶血液（mL）			a*	a*
试剂一（mL）	a*	a*	a*	a*

混匀（摇动几下离心管架）

试剂二（mL）	3	3	3	3
试剂三（mL）	1	1	1	
50%冰醋酸（mL）				1

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a*表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、试剂一的量，四者均相等。例如样品取0.1mL则标准品、无水乙醇、试剂一也取0.1mL，若样品取0.2mL则标准品、无水乙醇及试剂一也取0.2mL。因吸光度与加样量呈正比曲线，因而结果不受影响。

** 一般情况下，标准管、空白管及对照管每批只需做1~2只，若样本不存在溶血、脂血现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

规范操作方法标准管吸光度：当标准品取样量为0.1mL时，则分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.065~0.070（酶标仪测定200μL读数时为0.045左右）。当标准品取样量为0.2mL时，则标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.130~0.140（酶标仪测定200μL读数时为0.1左右）。

注：若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间40分钟延长至80分钟，但您的同一课题中MDA的检测都必须延长至80分钟，以免造成批间差异。

②、方法二：（微量法）（用此方法所测各管吸光度值比规范操作方法所得值要高，但不影响最终结果。）

先将已经按规范操作方法配好的MDA3号试剂用50%的冰醋酸按2：1稀释，例如将配好的MDA3号试剂100mL，加50%的冰醋酸50mL，混匀。也可以用多少配多少进行以下检测。

（注：50%冰醋酸的配制是50mL蒸馏水加50mL冰醋酸混合而成的。）

	空白管	标准管	测定管	对照管**
10n mol/mL标准品(mL)		a*		
无水乙醇（mL）	a*			
测试样品（mL）			a*	a*
试剂一（mL）	a*	a*	a*	a*

混匀（摇动几下离心管架）

试剂二（mL）	1.5	1.5	1.5	1.5
试剂三（mL）	1.5	1.5	1.5	
50%冰醋酸（mL）				1.5

Address: No. 388, Gaoxin 2nd Road, East Lake Hi - tech Development Zone, Wuhan, China

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40分钟，取出后流水冷却，然后3500~4000转/分，离心10分钟，（3000转/分以下离心时间需延长，目的使沉淀完全）。取上清***，532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

a* 表示所取的样品量、标准品量、无水乙醇的量、试剂一的量，四者均相等。例如样品取0.1mL则标准品、无水乙醇及试剂一也取0.1mL，若样品取0.2mL则标准品、无水乙醇及试剂一也取0.2mL。因吸光度与加样量呈正比曲线，因而结果不受影响。

** 一般情况下，标准管、空白管及对照管每批只需做1~2只，若样本不存在溶血、脂血现象，则对照管可以不测，用空白管来代替对照管。

*** 吸取上清比色时最好用移液器吸取上清加入比色皿中，尽量避免倾倒，以免沉淀进入比色皿，影响吸光度。

注：若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间40分钟延长至80分钟，但您的同一课题中MDA的检测都必须延长至80分钟，以免造成批间差异。

此方法标准管参考吸光度：当标准品取样量为0.1mL时，分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.103~0.112。当标准品取样量为0.2mL时，分光光度计测定标准管吸光度减去空白管的吸光度为0.206~0.224。

3、取某浓度的溶血液进行血红蛋白测定：

Hb测定：取100倍浓缩的Hb测试液1mL（本所有货供应），加水至100mL配成应用测试液，取1：x血球溶血液20μL加稀释好的Hb应用测试液5mL，充分混匀，静置5分钟，波长540nm，1cm光径，蒸馏水调零，比色，记录各管吸光度值。**Hb计算：**将吸光度值乘以367.7即为Hb 克数/升。如果血样量特少时，则样本量和试剂量均可减少一半或按比例减少。

4、红细胞中MDA的计算及举例：

①、计算公式：

$$\text{溶血液中MDA} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mgHb}} \right) = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{10 \text{nmol/ml}} \div \frac{\text{溶血液血红蛋白浓度}}{\text{mgHb/ml}}$$

* nmol/mgHb为纳摩尔/毫克血红蛋白

②、计算举例：

例1：取某人1:99血球溶血液0.1mL按方法一进行MDA测定，测定管OD为0.064，标准管OD为0.077，标准空白管OD为0.009，对照管OD为0.011，对照管也可用标准空白管OD为0.009代替，1:99血球溶血液中Hb含量为11.08gHb/L，即11.08mgHb/mL。则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{溶血液中MDA} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mgHb}} \right) &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{10 \text{nmol/ml}} \div \frac{\text{溶血液血红蛋白浓度}}{\text{mgHb/ml}} \\ &= \frac{0.064 - 0.011}{0.077 - 0.009} \times 10 \text{nmol/ml} \div 11.08 = 0.703 \text{nmol/mgHb} \end{aligned}$$

例2：取某人1:99血球溶血液0.1mL按方法二微量法进行MDA测定，测定管OD为0.084，标准管OD为0.100，标准空白管OD为0.015，对照管OD为0.017，对照管也可用标准空白管OD为0.015代替，1:99血球溶血液中Hb含量为11.08gHb/L，即11.08mgHb/mL。则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{溶血液中MDA} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mgHb}} \right) &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{10 \text{nmol/ml}} \div \frac{\text{溶血液血红蛋白浓度}}{\text{mgHb/ml}} \\ &= \frac{0.084 - 0.017}{0.100 - 0.015} \times 10 \text{nmol/ml} \div 11.08 = 0.711 \text{nmol/mgHb} \end{aligned}$$

(二)、全血中红细胞MDA检测方法（样本量多时用）

1、样本前处理：

- ①、**血球制备：**取肝素抗凝全血0.15mL，加2~3mL的生理盐水，2500~3000转/分离心5~10分钟（小鼠红细胞容易破裂，最好用1000~1500转/分离心5~10分钟），弃上清留沉淀的红细胞。上清一定要尽量吸净丢弃，以免影响结果。
- ②、**溶血液的制备：**取离心后沉淀的红细胞加所取全血体积4倍的蒸馏水（0.6mL），在旋涡混匀器上混匀1分钟使细胞充分溶解。
- ③、**抽提：**在上述溶血液中加入全血体积2倍的无水乙醇（0.3mL），（也可用95%乙醇代替）在旋涡混匀器上充分混匀30秒钟。
- ④、**沉淀蛋白：**再加全血体积2倍的三氯甲烷（0.3mL）置旋涡混匀器上混匀1分钟，然后3000~3500转/分，离心5~10分钟。此时液体分为三层，上层为MDA抽提液，中层为血红蛋白沉淀物，下层为三氯甲烷。取上清并记录体积，约0.9mL。

2、操作步骤：

- ①、**1nmol/mL标准应用液的配制：**将10nmol/mL的标准品10倍稀释，即取10nmol/mL的标准品1mL加9mL的无水乙醇配成1nmol/mL的标准应用液。
- ②、**检测操作：**（若发现检测样本吸光度太低，可以将水浴时间40分钟延长至80分钟，但您的同一课题中MDA的检测都必须延长至80分钟，以免造成批间差异。）

	空白管	标准管	测定管
1 nmol/mL标准品（mL）		0.8	
无水乙醇（mL）	0.8		
抽提液（mL）			0.8
试剂二（mL）	1.0	1.0	1.0
试剂三（mL）	1.0	1.0	1.0

离心管盖上盖，用针在盖上扎一小孔，旋涡混匀器混匀，95℃水浴（或用锅开盖煮沸）40分钟，取出后流水冷却，于532nm处，1cm光径，蒸馏水调零，测各管吸光度值。

3、全血中红细胞MDA计算及举例：

①、**计算公式：**
$$\text{全血中MDA} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{1 \text{nmol/ml}} \div \frac{\text{取样量}}{0.15 \text{ml}}$$

②、计算举例：

例1: 取某人的全血0.15m, 用生理盐水洗涤, 离心, 弃上清, 在沉淀的红细胞中加0.6mL蒸馏水, 混匀1分钟, 加0.3mL无水乙醇, 混匀30秒, 再加0.3mL氯仿, 混匀1分钟, 3500转/分离心8分钟, 取上层抽提液0.8mL检测, 得到标准管吸光度为0.112, 测定管吸光度为0.038, 空白管吸光度为

0.012, 则结果为:

$$\begin{aligned} \text{全血中MDA} &= \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{\text{取样量}} \\ (\text{nmol/ml}) &= \frac{0.038 - 0.012}{0.112 - 0.012} \times 1 \text{nmol/ml} \div \frac{0.15}{1} = 1.73 \text{nmol/ml} \end{aligned}$$

十一、参考值:

- 1:99的人的红细胞溶血液6.38±0.072nmol/mL,**
- 人血清(浆)4.06±0.6nmol/mL,**
- 10%大鼠脑匀浆4.72±1.44nmol/mgprot,**
- 10%大鼠肾匀浆2.70±0.46nmol/mgprot,**
- 10%大鼠肺匀浆1.65±0.44nmol/mgprot,**
- 10%大鼠心肌匀浆1.63±0.36nmol/mgprot**
- 小鼠血清(浆)5.30±0.73nmol/mL。**
- 10%小鼠脑匀浆16.3±5.04nmol/mgprot,**
- 5%小鼠心肌匀浆14.64±2.68nmol/mgprot,**
- 10%小鼠肌肉匀浆51.59±11.08nmol/mgprot,**
- 10%小鼠肝匀浆8.26±2.75 nmol/mgprot。**

十二、注意点:

- 1、离心管要刷洗干净, 尤其测微量样品时更为重要。
- 2、配制试剂时要充分混匀。测试过程中第一管吸的试剂要丢弃, 加样品或试剂时要垂直加, 不要加在管壁上。95℃水浴前要充分混匀。
- 3、天冷时试剂一会凝固, 一定要水浴加热至透明方可应用。
- 4、水浴时间及温度要固定。没有水浴锅的可用铝锅、铝盒、铝盆等开盖煮沸即可。
- 5、离心沉淀一定要充分, 否则影响吸光度, 造成结果不稳定。这种情况可增加离心转速(3000转/分以上)或者延长离心时间使沉淀完全。
- 6、比色时注意不要将沉淀倒入比色杯中, 最好用移液器吸入比色皿。
- 7、冬天若发现测试溶液呈雾状可以轻轻放水浴稍稍加温, 待溶液溶解呈透明状态用移液器吸取放入比色杯中, 若仍然呈雾状, 则考虑为高脂血症。
- 8、若为高脂血清或油脂类物质, 可加等量的无水乙醇处理后方可测定, 具体操作方法见前。
- 9、样本取样量: 若您的样量较多, 取样量可以加倍, 抽提过程中, 蒸馏水、无水乙醇、氯仿均要加倍。若您的样本为贫血病人的血样, 则取样量也要加倍, 抽提过程中, 蒸馏水、无水乙醇、氯仿的量则不变。
- 10、洗涤红细胞时, 离心后的上清要尽量吸取干净, 以保证抽提液体积准确。
- 11、95℃水浴时最好用带盖的离心管, 以免反应液的蒸发。若没有带盖的离心管可用冰箱保鲜膜盖好, 用橡皮筋扎好后在保鲜膜上用针刺一小孔即可代替盖子。

十三、本试剂盒优点:

- 1、本试剂盒中试剂均无刺激性气味, 对操作人员无任何毒害。
- 2、快速准确, 操作简便, 每小时可测100例以上样本。
- 3、灵敏度高, 血清或血浆样品只需0.1mL, 或者更少。
- 4、再现性好, 变异系数CV=1.5%, 同一份标本数次测试结果相差极微。
- 5、呈色稳定, 呈色后24小时内测吸光度不变。
- 6、试剂稳定, 保存期一年以上。
- 7、血清样品放置4℃, 3~5天内测试结果不变。-20℃以下可保存3个月至半年。
- 8、测试面广, 可测血清(浆)、各种组织匀浆, 培养细胞等。
- 9、主要原料均为进口, 但价格适中。
- 10、不需昂贵与特殊仪器, 只需恒温水浴箱或者铝锅、铝盆开盖煮沸, 及721、722、751、752分光光度计任一型号均可。
- 11、不受气温等外界因素的影响。是目前国内最稳定的MDA测试方法。

